云南植物研究 2006, **28** (2): 108~114
Acta Botanica Yunnanica

四个 DNA 片段在山茶属分子系统学研究中的应用*

杨俊波[1,2], 李洪涛[1], 杨世雄[1], 李德铢[1**], 杨莹燕[1]
(1 中国科学院昆明植物研究所生物多样性与生物地理学重点实验室, 云南 昆明 650204;
2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 选取山茶属 14 个组中的 10 组 21 种植物对目前常用于属内种间的 4 个 DNA 片段 (ITS、*waxy*、*trn*L-F、*rpL*16) 进行序列测定。结果表明: (1) 来自叶绿体基因组的 2 个片段 (*trn*L-F、*rpL*16) 其 PCR 扩增和测序都很容易, 但两者的进化速率都非常慢, 序列矩阵只有很少信息位点 (*trn*L-F 含 9 个, *rpL*16 为 20 个), 不能提供必要的系统发育信息。(2) 来自核基因组的 ITS 片段其 PCR 产物比较容易获得, 但其序列的测定存在较多问题。(3) *waxy* 是来自核基因组的另一个片段, 其 PCR 扩增因受模板 DNA 的数量和质量的影响很大而有一定难度, 但其进化速率较快, 序列矩阵具有较多信息位点 (92 个), 并且在山茶属是单拷贝, 这对于解决山茶属这类具有许多近缘物种的类群的系统关系有重要价值。基于 *tsn*L-F、*rpL*16 和 *waxy* 三组数据所建分子系统树支持山茶属为一单系, 但属下系统由于取样等原因有待进一步研究。

关键词: 山茶属; DNA 序列; 进化速率; 分子系统学

中图分类号: Q 946, Q 949　　文献标识码: A　　文章编号: 0253-2700(2006)02-108-07

The Application of Four DNA Sequences to Studying Molecular Phylogeny of *Camellia* (Theaceae)*

YANG Jun-Bo[1,2], LI Hong-Tao[1], YANG Shi-Xiong[1], LI De-Zhu[1**], YANG Yun-Yan[1]
(1 *Laboratory of Biodiversity and Biogeography*, *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204, China;
2 *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100039, China)

Abstract: Four DNA sequences—ITS, *waxy*, *trn*L-F, and *rpL*16 have been used to resolve the inter-species relationships of twenty-one species representing 10 out of the 14 sections in *Camellia*. The results indicated that: (1) PCR amplification and sequencing were easy for *trn*L-F and *rpL*16 sequences, however, the divergence rates of the two chloroplast sequences are too slow with few phylogenetically informative sites in data matrixes (9 sites in *trn*L-F and 20 sites in *rpL*16), so they could not provide enough phylogenetic information; (2) The PCR products of ITS were easily obtained, but there were still many problems in sequencing; (3) The *waxy* gene, another sequence from the nuclear genome, has significant values in resolving the infrageneric relationships in *Camellia*. The divergence rate is faster than aforementioned sequences. There were more informative sites (92) in data matrix though PCR amplification was difficult because it is affected by quantity and quality of template DNA and it is a single copy gene in *Camellia*. The present study indicated that the *waxy* gene had great potential values in the systematic study of *Camellia* while other three sequences are unfitted to resolve the problem. The results of our DNA analysis of three segments support that the genus *Camellia* is a monophyletic group, but the inter-species relationships is still needed more study.

Key words: *Camellia*; DNA sequences; Divergence rate; Molecular phylogeny

---

* 基金项目: 科技部国家科技基础条件平台工作项目 (2004DKA30430), 云南省科学技术突出贡献奖资助项目 (KIB-WU-2001-3)

** 通信作者: Author for correspondence. E-mail addresses: dzl@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2005-08-09, 2005-10-17 接受发表

作者简介: 杨俊波 (1970-) 男, 高级工程师, 主要从事植物分子系统发育与分子进化研究。

山茶属（*Camellia*）是山茶科（Theaceae）中种类较多、系统上较为原始的一个属，全产亚洲，我国是该属植物的分布中心，拥有绝大多数的种类，依据不同的分类标准做出的统计结果显示，我国拥有该属的 80% ~ 95% 的种类（闵天禄，2000）。山茶属包括了举世闻名的观赏花卉（如茶花 *C. japonica*，滇山茶 *C. reticulata*，金花茶 *C. petelotii* 或 *C. nitidissima*）、世界三大饮料之一的茶叶（茶 *C. sinensis*，普洱茶 *C. sinensis* var. *assamica*）和我国南方重要的木本油料植物（油茶 *C. oleifera*）等重要的经济植物，一直为农学、园艺学、分类学家所关注。1958 年 Sealy 提出了第一个完整的山茶属系统，张宏达（1981，1996）和闵天禄（1996，1999）先后提出了另外两个分类系统。三者对该属的种类、系统演化、起源及扩散存在不同的、甚至是相反的观点。这些观点主要是依据分类学、细胞学、孢粉学、植物地理学等方面的资料，虽然在一定程度上澄清、解决了一些系统学上的问题，但更多的只是揭示和提出了不少系统学上的问题，没有解决的、遗留的问题仍然相当突出。现有的研究结果显示，在山茶属的分类系统和物种的甄别上，目前所采用的各种研究方法和手段都有一定的局限性，而研究材料特别是实验材料的代表性也有值得改进之处，很有必要引入新的研究手段，加大研究的取样，开展更大范围、更加深入的多学科的综合研究。上世纪 90 年代，随着分子系统学的兴起和发展，分子生物学的研究手段开始被引入山茶属的系统学研究，Wachira 等（1995）关于茶叶的遗传多样性研究（RAPD 标记）和施苏华等（1998）关于金花茶组的 RAPD 分析的研究结果已相继发表，唐绍清等（2004）通过 ITS 序列分析探讨了金花茶组的系统学问题，为山茶属的分子系统学的研究开了一个头。本研究选取山茶属 14 个组中的 10 组 21 种植物作为该属代表，对目前常用于属内种间的 4 个 DNA 片段（ITS、*waxy*、*trn*L-F、*rpL*16）进行 PCR 扩增后直接测序，以大体了解这 4 个 DNA 片段在该属分子系统学研究中的应用可行性，确定适合于该属分子系统学研究的 DNA 片段。

1　材料与方法

1.1　实验材料

本研究按闵天禄的 14 组系统，选取其中 10 组 21 种

表 1　实验材料和凭证标本

Table 1　Material and Voucher specimen

Sect.	Species	Voucher	Origin
Sect. 1. Piquetia	——		
Sect. 2. Archecamellia	*Camellia indochinensis*	S. X. Yang 1114	广西南宁
	C. longzhouensis	S. X. Yang 1112	广西龙州
	C. amplexicaulis	S. X. Yang 1118	越南谅山
	C. flava	龚洵 s. n.（1）	越南老街
Sect. 3. Cylindrica	——		
Sect. 4. Thea	*C. sinensis*	S. X. Yang 1087	昆明植物园栽培
	C. sinensis var. *assamica*	S. X. Yang 1013	云南瑞丽
	C. grandibracteata	S. X. Yang 1068	云南云县
	C. membranisepala	S. X. Yang 1093	昆明植物园栽培
Sect. 5. Longipedicellata	*C. hekoensis*	S. X. Yang 1167	云南河口
Sect. 6. Corallina	——		
Sect. 7. Theopsis	——		
Sect. 8. Eriandria	*C. caudata*	S. X. Yang 1344	云南金平
Sect. 9. Heterogenea	*C. yunnanensis* var. *camellioides*	S. X. Yang 1091	昆明植物园栽培
	C. wardii var. *muricatula*	S. X. Yang 1046	云南盈江
Sect. 10. Stereocarpus	*Camellia pubipetala*	S. X. Yang 1119	广西凭祥
Sect. 11. Tuberculata	*C. ilicifolia*	S. X. Yang 1096	昆明植物园栽培
	C. pyxidiacea	S. X. Yang 1072	昆明植物园栽培
Sect. 12. Camellia	*C. edithae*	S. X. Yang 1081	昆明植物园栽培
	C. pitardii	S. X. Yang 1089	昆明植物园栽培
	C. mairei var. *lapidea*	S. X. Yang 98994	贵州赤水
Sect. 13. Paracamellia	*C. oleifera*	S. X. Yang 1017	云南陇川
	C. sasanqua	S. X. Yang 1082	昆明植物园栽培
Sect. 14. Calpandria	*C. connata*	JBYang 200507	泰国清迈
outgroup	*Apterosperma oblata*	S. X. Yang 1106	广东阳春
	Schima kwangtungensis	S. X. Yang 1104	广东阳春

植物作为该属代表，同族另外两属的2种作为外类群（表1）。用于实验的植物材料均是新鲜或经硅胶快速干燥的叶片。所有凭证标本均存于中国科学院昆明植物研究所标本馆（KUN）。

1.2　实验方法

采用改良的CTAB法（Doyle and Doyle，1987）提取植物总DNA，部分总DNA经华舜纯化柱纯化。聚合酶链式反应（PCR）在PERKIN ELMER 9600型PCR仪上进行，各片段扩增的引物同时用作测序引物见表2。PCR反应体系和PCR热循环反应根据不同片段进行适当调整。PCR扩增产物经华舜纯化柱纯化后直接用于测序。

用DNA Star软件进行序列校对和排序。用PAUP4 0b8（Swofford．1999）软件进行系统发育分析。采用最大简约法获得最大简约树。

表**2**　本文所选用的**PCR**扩增引物

Table 2　Primers for PCR amplification and sequencing

序列名称	序列	来源
ITS	ITS4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' ITS5: 5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'	White *et al*., 1990
trn L-F	trnL: 5' CGAAATCGGTAGACGCTACG 3' trnF: 5' ATTTGAACTGGTGACACGAG 3'	Taberlet *et al*., 1991
*rpL*16	F435: 5' CTCAAAAAGGTAAAGAGCCCTGAGT 3' R1516: 5' CCCTTCATTCTTCCTCTATGTTG 3'	Jorden *et al*., 1996
waxy	GBSS1F1: 5' TGCCACCACTGTAAGATTC 3' GBSS1R2: 5' CCTTCTTTCACAGTGTCAAC 3'	本实验室设计

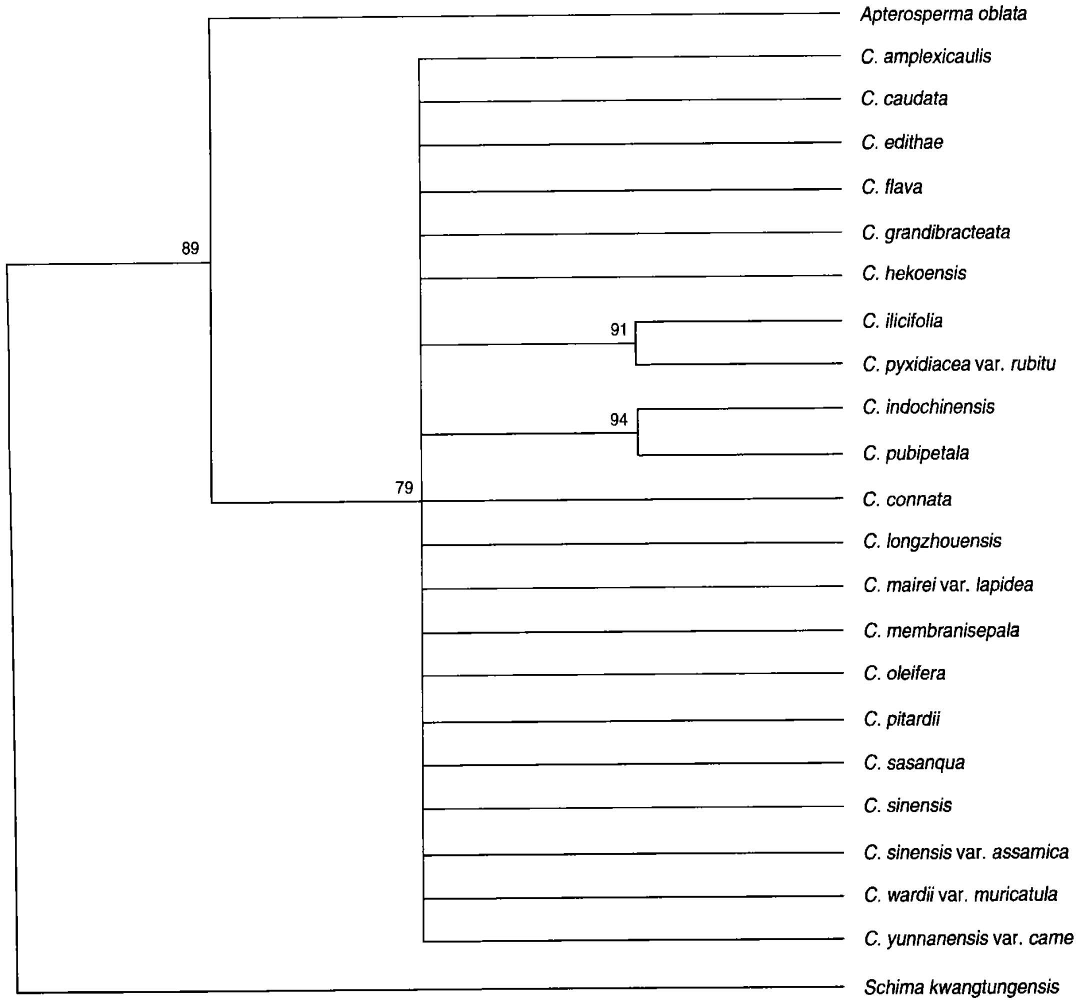

图1　基于2棵最简约树的*rpL*16严格一致树

Fig. 1　The strict consensus of two most parsimonious trees based on *rpL*16 sequences

2　结果

2.1　PCR 扩增结果

用文献报道的一般 PCR 方法能比较容易地扩增到山茶属的 ITS、*trn*L-F 和 *rp*L16 3 个 DNA 片段, 但 *waxy* 基因的扩增比较困难, 经过调整 PCR 反应体系（主要是模板 DNA 的含量），增加反应循环数大多数物种能得到用于直接测序的 PCR 产物。

2.2　序列测定

在 4 个用 PCR 产物直接测序的 DNA 片段中, 除了 ITS 序列外, 其余 3 个片段都得到了所需序列。经过多次的测序表明, 用 PCR 产物直接测序在山茶属内有很大困难, 原因见讨论。

2.3　核苷酸序列的排序和系统树的构建

表 3 给出了 *trn*L-F、*rp*L16 和 *waxy* 3 个基因片段的信息参数。*trn*L-F 序列长度为 881～895 bp, 排序后长 913 bp, 其中变异位点有 39 个, 但只有 9 个信息位点; *rp*L16 序列长度为 907～940 bp 排序后长 951 bp, 其中变异位点有 77 个,

表 3　*trn*L-F、*rp*L16 和 *waxy* 基因片段的信息参数

Table 3　Informative parameters for *trn*L-F, *rp*L16 and *waxy*

数据 Data	排列长度 Aligned length	变异位点 Variable site	信息位点 Informative site	信息位点（%） Informative site（%）	树长 Tree length	CI	RI
*trn*L-F	913	39	9	1	41	0.9756	0.244
*rp*L16	951	77	20	2	111	0.9009	0.491
waxy	780	111	92	12	312	0.7821	0.645

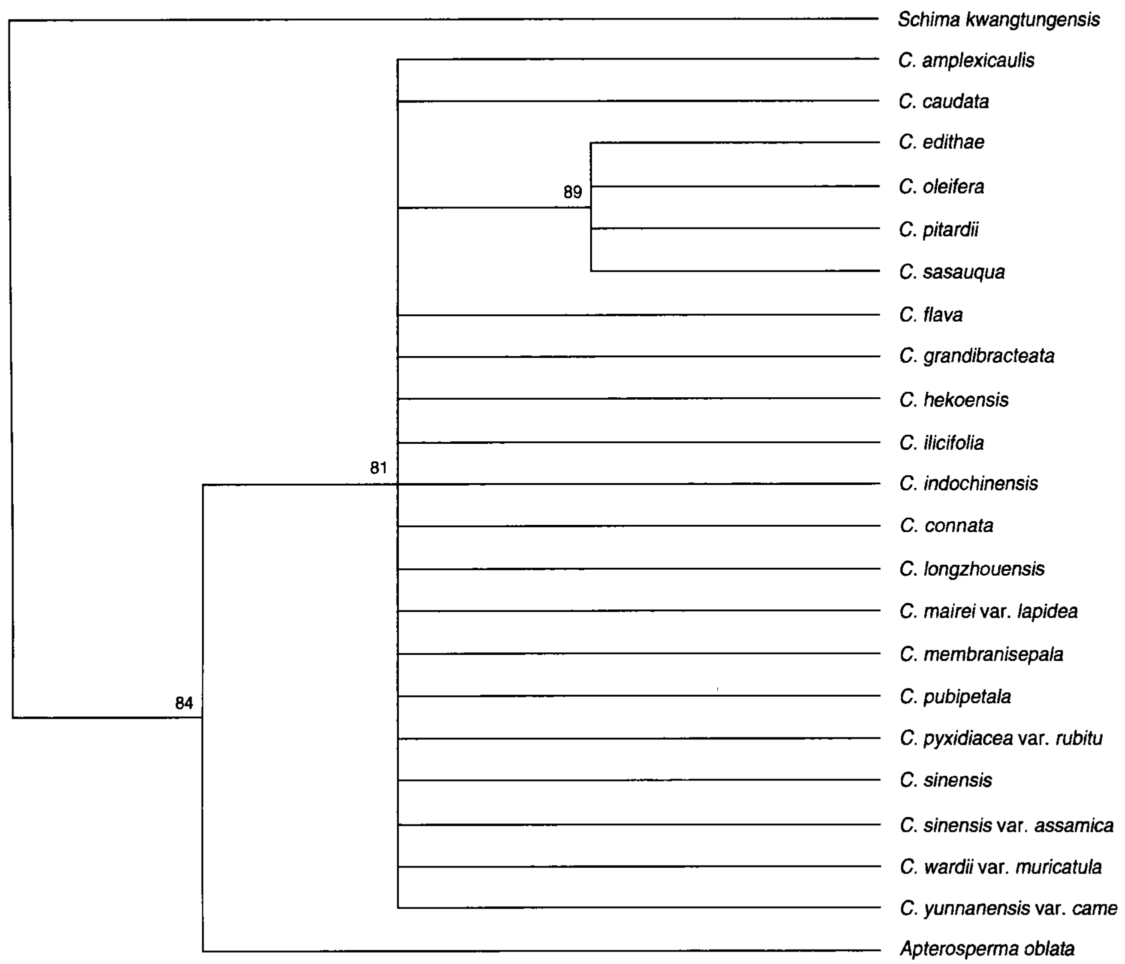

图 2　基于 2 棵最简约树的 *trn*L-F 严格一致树

Fig. 2　The strict consensus of two most parsimonious trees based on *trn*L-F sequences

有20个信息位点; *waxy* 序列长度为689~ 706 bp 排序后长780 bp, 其中变异位点有111 个, 有92 个信息位点。3 个基因片段的最简约树 (MP) 的数目分别是, *trn*L-F 序列 (2), *rpL*16 序列 (2), *waxy* 序列 (3), 相应的一致树的树长, 一致性指数 (CI) 和保持性指数 (RI) 见表3。各基因片段的最简约树的拓扑结构相差很大, *trn*L-F 和 *rpL*16 序列的分支形成多歧平行结构 (Polytomy) (图1, 图2)。*waxy* 序列提供了分辨率较高的 MP 树, 绝大多数序列都形成二歧分支 (图3)。

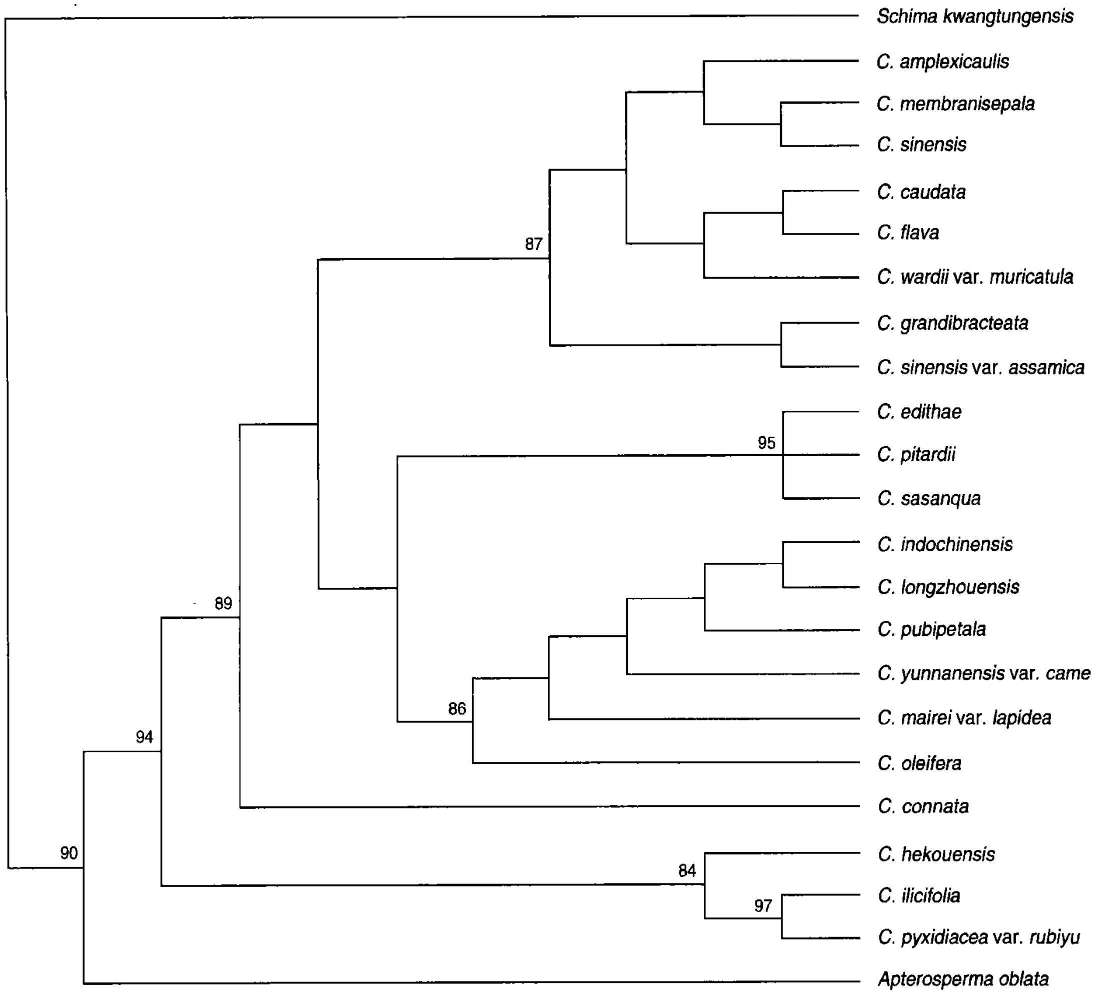

图3 基于3棵最简约树的 *waxy* 严格一致树

Fig. 3 The strict consensus of three most parsimonious trees based on *waxy* sequences

3 讨论

分子系统学经过近年的快速发展, 许多 DNA 片段已被应用于各分类阶元的系统学研究 (Tian and Li, 2002), 虽然不同的 DNA 片段本身在植物系统学的研究中常有一相对稳定的适用范围, 如: *rbc*L、18SrDNA 一般适用于较高分类阶元, 甚至整个种子植物谱系间的系统发育探讨; *trn*L-F、*rpL*16、ITS 等则被广泛应用于较低分类阶元的系统发育研究, 但同一 DNA 序列在不同分类群间的进化速率往往有所差异 (有时甚至相差很大), 因此, 选取适合于特定类群的特定 DNA 片段无疑是分子系统学研究成败的关键。

从目前的研究情况来看, 能在属内种间广泛应用的 DNA 片段还十分有限, 大多数有很强的类群差异性。在植物叶绿体基因组 (cpDNA) 中 *trn*L-F、*mat*K、*rpL*16 等属于进化较快的序列, 在科内属间有很高的应用价值 (Bayer 等, 2000; Mes 等, 1997; Plunkett 等, 1997; Kron 等,

1997)，在某些特定类群中这些片段也为种间甚至种下的系统学研究提供了一定价值（Jordan 等，1996; Baum，1998; Xiang 等，1998; Stanford 等，2000）。但本研究表明：来自叶绿体基因组的 2 个 DNA 片段（*trn*L-F、*rpL*16）由于进化速率太慢（不同物种间的变异小于 1%），不能提供必要的系统发育信息，都不适合山茶属分子系统学的研究。由于 *rpL*16 在 cpDNA 中被认为是进化最快的 DNA 片段之一（Small 等，1998; Downie 等，2000），因此，在山茶属分子系统学的研究中来自叶绿体基因组的序列应用价值可能相对较小。被广泛应用于较低分类阶元系统发育研究的核基因组 ITS 序列，在山茶属内通过 PCR 产物直接测序未能成功。可能主要有以下原因：(1) 相对较高的 GC 含量引起测序的困难，从已有的对金花茶组的研究表明，该属 ITS 序列可能均具有较高的 GC 含量（唐绍清等，2004）；(2) 近来许多研究表明在许多类群中 ITS 序列由于一致性进化（concerted evolution）不完全，存在多个不同拷贝（Baldwin 等，1995; Koch 等，2003），这个原因可直接导致 PCR 产物直接测序失败。山茶属 ITS 序列的一致性进化是否完全，是否存在多个不同拷贝以至 ITS 序列本身在该属的进化机制都有待进一步研究。(3) 属内广泛存在的多倍化和杂交现象（Parks，1990; Kondo，1977 a, b，1978），构成了测序困难的另一个原因。由于这些问题的存在 ITS 序列在山茶属内的应用存在很大的局限。

鉴于上述原因，一些核基因组内进化快的单拷贝或低拷贝基因，开始被应用于较低分类阶元系统发育研究（Peralta 等，1997; Xiao and Clifford，2002; Denton 等，1998）。由于这类基因是单拷贝，避免了多拷贝基因如 ITS 片段存在的直系同源（Orthology）和并系同源（Paralogy）的问题，同时单拷贝基因由于积累和固定遗传变异较多拷贝基因相对容易一些，从而能提高变异水平上的分子进化速率，有利于解决近缘物种的系统关系（Müller 等，1999）。*waxy* 基因编码一种淀粉合成酶，全长 3 kb，包括 13 个外显子和 13 个内含子，在大部分植物科内，*waxy* 基因是单拷贝（Mason-Gamer 等，1998），如禾本科（Guo and Li，2004）、茄科、杜鹃花科，仅少数科为多拷贝，如在蔷薇科中，该基因有 2～3 个拷贝（Evans 等，2000）。我们的研究表明在山茶属内 waxy 基因是单拷贝的，并且具有较高的序列变异率（不同物种间的变异在 5% 左右），这对于解决山茶属这类具有许多近缘物种的类群的系统关系有重要价值。

山茶属种类较多，形态变异较大，它是不是一个单系类群是该属研究首先要回答的一个问题。早期的研究，山茶属曾被分为 9 个小属，Sealy（1958）的研究认为该类群的种子无翅，胎座斜生与山茶科其它种类明显分开，并据此认为该属为一不可分割的整体，后来两个对该属有较大影响的系统（张宏达，1981; 闵天禄，2000）同意 Sealy 的单系概念。我们分别基于 3 个 DNA 片段的分析结果也支持山茶属作为一个单系类群。作为山茶属的属下分类系统，目前 3 个影响较大的系统的看法相差很大，三者对该属的种类、系统演化、起源及扩散存在不同的、甚至是相反的观点。我们的研究工作由于取样较少，虽得到了几个有较高支持率的分支，但这些结果还不足于对目前的分类系统作出评价，高密度多基因的进一步研究正在进行中。

〔参考文献〕

闵天禄，2000. 世界山茶属的研究［M］. 昆明：云南科技出版社

Baldwin BG, Sanderson MJ, Wojciechowski MF, *et al*, 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny［J］. *Ann Missouri Bot Gard*, **82**: 247—277

Baum DA, Small RL, Wendel JF, 1998. Biogeography and floral evolution of Baobabs (Adansonia, Bombacaceae) as inferred from multiple data sets［J］. *Syst Biol*, **47**: 181—207

Bayer RJ, Puttock CF, Kelchner SA, 2000. Phylogeny of South African Gnaphalieae (Asteraceae) based on two non-coding chloroplast sequences［J］. *Amer J Bot*, **87**: 259—272

Chang HT（张宏达），1981. A taxonomy of the genus *Camellia*［J］. *Acta Sci Nat Univ, Sunyatseni*（中山大学学报），monographic series **1**: 1—180

Chang HT（张宏达），1996. Diagnosis on the systematic development of Theaceae ⅳ. A review on the Sect. Chrysantha and Archecamellia of the genus *Camellia*［J］. *Acta Sci Nat Univ, Sunyatseni*（中山大学学报），**35** (1): 77—83

Denton AL, McConaughy BL, Hall BD, 1998. Usefulness of RNA polymerase II coding sequences for estimation of green plant phylogeny

[J]. *Mol Biol Evol*, **15** (8): 1082—1085

Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, **19**: 11—15

Downie SR, Katz-Downie DS, Watson MF, 2000b. A phylogeny of the flowering plant family Apiaceae based on chloroplast DNA *rpL*16 and *rpo*C1 intron sequences: towards a suprageneric classification of subfamily Apioideae [J]. *Amer J Bot*, **87**: 273—292

Evans RC, Alice LA, Campbell CS, *et al*, 2000. The granule-bound starch synthase (GBSSI) gene in the Rosaceae: multiple loci and phylogenetic utility [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **17**: 388—400

Guo ZH, Li DZ, 2004. Phylogenetics of the Thamnocalamus group and its allies (Gramineae: Bambusoideae): inference from the sequences of GBSSI gene and ITS spacer [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **30** (1): 1—12

Jordan WC, Courtney MW, Neigel JE, 1996. Low levels of interspecific genetic variation at a rapidly evolving chloroplast DNA locus in North American duckweeds (Lemnaceae) [J]. *Amer J Bot*, **83**: 430—439

Koch MA, Dobes C, Thomas MO, 2003. Multiple hybrid formation in natural populations: concerted evolution of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (ITS) in north American *Arabis divaricarpa* (Brassicaceae) [J]. *Mol Biol Evol*, **20** (3): 338—350

Kondo K, 1977a. Chromosome numbers in the *Camellia* [J]. *Biotropica*, **9** (23): 86—94

Kondo K, 1977b. Cytological studies in cultivated species of China I: Diploid species and their hybrids [J]. *Jap J Breed*, **27**: 28—38

Kondo K, 1978. Cytological studies in cultivated species of China III: Tetraploid species and hybrids between diploid species and hexaploid species [J]. *Jap J Breed*, **27**: 28—38

Kron KA, 1997. Phylogenetic relationship of Rhododndroideae (Ericaceae) [J]. *Amer J Bot*, **84**: 973—980

Li JH, Donoghue, 1999. More Molecular Evidence for Interspecific Relationships in *Liquidambar* (Hamamelidaceae) [J]. *Rhodora*, **101** (905): 87—91

Mason-Gamer RJ, Weil CF, Kellogg EA, 1998. Granule-bound starch synthase: structure, function, and phylogenetic utility [J]. *Mol Biol Evol*, **15**: 1658—1673

Mes TM, Wiejers GJ, Hart HT, 1997. Phylogenetic relationships in *Monanthes* (Crassulaceae) based on morphological, chloroplast and nuclear DNA variation [J]. *J Evol Biol*, **10**: 193—216

Ming TL (闵天禄), 1996. The evolution and distribution of genus *Camellia* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **18** (1): 1—13

Ming TL (闵天禄), 1999. A systematic synopsis of the genus *Camellia* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **21** (2): 149—159

Möller M, Clokie M, Cubas P, *et al*, 1999. Integrating molecular phylogenies and developmental genetics: a Gesneriaceae case study [A]. In Hollingsworth PM, Barenan RM, Gornall RJ, Eds, Molecular Systematics and Plant Evolution [M]. London: Taylor & Francis, 375—402

Parks R, 1990. Cross-compatibility studies in the genus *Camellia* [J]. *International Camellia J*, **10**: 37—54

Peralta IE, Ballard JR, Spooner DM, 1997. GBSSI gene intron phylogeny of tomatoes, *Solanum* subsect. *Lycopersicum* (Solanaceae) (Abstract) [J]. *Amer J Bot*, **84**: 222

Plunkett GM, Soltis DE, Soltis PS, 1997. Clarification of the relationship between Apiaceae and Araliaceae based on *mat*K and *rbc*L sequence data [J]. *Amer J Bot*, **84**: 565—580

Sealy JR, 1958. A Revision of the Genus *Camellia* [M]. London: The Royal Horticultural Society, 239

Shi SH (施苏华), Tang SQ (唐绍清), Chen YQ (陈月琴), *et al*, 1998. Phylogenetic relationships among eleven yellow-flowered *Camellia* species based on random amplified polymorphic DNA [J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), **36** (4): 314—322

Small RL, Ryburn JA, Cronn RC, *et al*, 1998. The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear Adh sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group [J]. *Amer J Bot*, **85**: 1301—1315

Stanford AM, Harden R, Parks CR, 2000. Phylogeny and biogeography of *Jugland* (Juglandaceae) based on *mat*K and ITS sequence data [J]. *Amer J Bot*, **87**: 872—882

Swofford DL, 1999. PAUP* 4.0. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) [M]. Sinauer Associates, Sunderland MA

Taberlet PL Gielly, Pautou G, Bouvet J, 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. *Plant Mol Biol*, **17**: 1105—1109

Tang SQ (唐绍清), Shi SH (施苏华), Zhong Y (钟杨), *et al*, 2004. Phylogenetic relationships of golden camellias (sect. *Chrysantha*, *Camellia*) in China: evidence from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA [J]. *Guihaia* (广西植物), **24** (6): 488—492

Tian X (田欣), Li DZ (李德铢), 2002. Application of DNA sequences in plant phylogenetic study [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **24** (2): 170—184

Wachira FN, Waugh R, Hackett CA, *et al*, 1995. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers [J]. *Genome*, **38**: 201—210

White TJ, Bruns T, Lee S, *et al*, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]. In Innis M, Gelfand D, Sninsky J, *et al*, PCR Protocols: A Guide to Methods and Application [M]. San Diego: Academic Press, 315—322

Xiang QY, Crawford DJ, Wolfe AD, *et al*, 1998. Origin and biogeography of *Aesculus* L. (Hippocastanaceae): A molecular phylogenetic perspective [J]. *Ann Missouri Bot Gard*, **80**: 723—734

Xiao TJ, Clifford R Parks, 2002. Molecular Analysis of Genus *Camellia* [M]. American Camellia Yearbook, 52—58